

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1926-1927

N° 19

RECHERCHES
SUR L'HÉMOLYSINE STREPTOCOCCIQUE

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le Juillet 1927

PAR

LAVALLE (JACQUES)

Pharmacien

Ex-Interne de l'Hôpital Départemental de la Seine

Ancien élève de l'Institut Pasteur

Membre de la Société de Chimie Biologique

JURY { MM. RADAIS, *Président.*
GRIMBERT, *Professeur.*
LUTZ, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE P. BATON

79, Faubourg Saint-Martin

1927

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1926-1927

N° 19

RECHERCHES
SUR L'HÉMOLYSINE STREPTOCOCCIQUE

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le *Juillet 1927*

PAR

LAVALLE (JACQUES)

Pharmacien

Ex-Interne de l'Hôpital Départemental de la Seine

Ancien élève de l'Institut Pasteur

Membre de la Société de Chimie Biologique

JURY { MM. RADAIS, *Président.*
GRIMBERT, *Professeur.*
LUTZ, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE P. BATON

79, Faubourg Saint-Martin

1927



Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. ̄, ̄ I.
PERROT, *Assesseur*, O. ̄, ̄ I.
G. DURSENT, *Secrétaire*, ̄, ̄ I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, C. ̄, ̄ I.	Botanique générale.
H. GAUTIER, O. ̄, ̄ I.	Chimie minérale.
RADAIS, O. ̄, ̄ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, C. ̄, ̄ I.	Chimie organique.
PERROT, O. ̄, ̄ I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, ̄, ̄ I.	Zoologie.
N	Physique.
GRIMBERT, ̄, ̄ I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. ̄, ̄ I.	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O. ̄, ̄ I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ̄, ̄ I.	Toxicologie.
BOUGAULT, ̄, ̄ I.	Chimie analytique.
GORIS, ̄, ̄ I.	Pharmacie galénique.

Doyens honoraires : MM. GUIGNARD, C. ̄, ̄ I: et H. GAUTIER, O. ̄, ̄ I.

Professeurs honoraires : MM. MOUREU, G. O. ̄, ̄ I. et A. VILLIERS, ̄, ̄ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. TASSILLY, ̄, ̄ I.	Minéralogie.
MARC HONNORAT, ̄, ̄ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, ̄, ̄ I.	Cryptogamie.
GUÉRIN, ̄, ̄ I.	Botanique.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ̄, ̄ I.	MM. LUTZ, ̄, ̄ I.	MM. DELABY.
DAMIENS, ̄, ̄ I.	LAUNOY, ̄, ̄ I.	PICON, ̄, ̄ I.
TASSILLY, ̄, ̄ I.	HÉRISSEY, ̄, ̄ I.	FABRE, ̄, ̄ I.
GUÉRIN, ̄, ̄ I.		MASCRÉ, ̄, ̄ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ̄, ̄ I.	Chimie générale.
COUSIN, ̄, ̄ I.	Chimie analytique.
SOUÈGES, ̄, ̄ I.	Micrographie.
LEROUX, ̄, ̄ I.	Physique.
DEVAL, ̄, ̄ I.	Microbiologie.
N.	Travaux généraux de 4 ^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ̄, ̄ I.

A MON PÈRE,
A MA MÈRE.

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A M. le Professeur Maxime RADAIS,

A M. le Professeur Maurice NICOLLE,
Hommage respectueux.

A M. le Docteur COTONI,

A M. le Docteur Vétérinaire CÉSARI,
(Chefs de Laboratoire à l'Institut Pasteur)

en témoignage de ma reconnaissance pour leur sympathie
et leur fructueux enseignement.

RECHERCHES SUR L'HÉMOLYSINE STREPTOCOCCIQUE

L'hémolyse produite par les streptocoques a donné lieu à des recherches très nombreuses, mais aujourd'hui encore, elle est loin d'être complètement connue et expliquée. La diversité des opinions est due aux différentes techniques employées, au pouvoir hémolytique variable des échantillons de streptocoques, à la durée souvent éphémère du pouvoir hémolytique d'une même culture, enfin à la fragilité de l'hémolysine streptococcique. L'étude de l'hémolyse produite par les streptocoques est cependant, à divers titres, d'un grand intérêt. Le pouvoir hémolytique est un caractère employé couramment comme moyen de différenciation des streptocoques entre eux et avec les autres espèces microbiennes (Schottmüller). On a soutenu qu'il existait une relation constante entre le pouvoir hémolytique d'un échantillon de streptocoques, son activité pathogène chez les animaux d'expérience et encore la gravité des infections streptococciques humaines. Enfin il est intéressant de comparer l'hémolysine streptococcique aux hémolysines des autres bactéries.

Knorr (1) (1893) semble être le premier auteur décrivant des altérations hémolytiques chez les lapins inoculés dans le péritoine ou sous la peau avec certaines cultures de streptocoques ; il signale l'infiltration séro-sanguinolente du tissu conjonctif sous-cutané, les épanchements séro-hématiques de la plèvre, du péritoine et du péricarde, l'aspect liquide et laqué du sang du cœur.

Marmorek (2) a mentionné brièvement des lésions dès 1895, Bordet (3) (1897), von Lingelsheim (1899) les ont également décrites. Lubenan (4) (1901) a appliqué à l'étude de l'hémolyse streptococcique la technique de Neisser et Wechsberg. Besredka (5) (1901),

(1) Z. f. Hyg., t. 13, 1893, p. 427.

(2) Ann. Inst. Pasteur, 1895, t. 9, p. 593.

(3) Ibid., 1897, t. 11, p. 177.

(4) Centralbl. f. Bak., 1 Abt., XXX, 356, 402.

(5) Ann. Inst. Pasteur, 1901, t. 15, p. 880.

travaillant avec le streptocoque de Marmorek a fixé certaines conditions expérimentales qui permettent d'obtenir une hémolysine active. Il a constaté la filtrabilité de l'hémolysine dans les cultures en sérum de lapin diluées d'eau physiologique, sa propriété de dissoudre les hématies de plusieurs espèces animales, sa sensibilité à la chaleur, ses variations suivant l'espèce animale qui fournit le sérum utilisé comme milieu de culture, enfin l'impossibilité d'obtenir une antistreptolysine chez les animaux.

Comme le note Berdnikoff (1) dans un article très documenté, les recherches portant sur l'hémolysine streptococcique s'orientent à partir de 1901 dans deux directions principales. Les uns, comme Bordet, Besredka, étudient les conditions de production de l'hémolysine et les rapports de la fonction hémolytique avec la fonction toxique d'immunité, la gravité des infections streptococciques. Les autres utilisent le caractère hémolytique pour classer les streptocoques (von Lingelsheim (1899), Marmorek (2) (1902), Schottmüller (1903). Ces deux courants n'englobent pas d'ailleurs tous les travaux publiés sur l'hémolysine streptococcique. D'autres recherches tendent à élucider le mécanisme de l'hémolyse et pénétrer la nature de l'hémolysine.

(1) Arch. des Sc. biol. publiées par l'Inst. Impérial de Méd. Exp. à St-Petersbourg, t. XV, N° 3 et 4.

(2) Ann. Inst. Pasteur, 1902, t. 16, p. 172.

L'HÉMOLYSINE *in vitro*

MISE EN EVIDENCE ET TITRAGE

Diverses techniques ont été proposées pour la mise en évidence de l'hémolysine streptococcique dans les milieux de culture.

1°) MILIEUX SOLIDES.

Marmorek a, le premier, appliqué à l'étude de l'hémolysine streptococcique la technique des cultures sur gélose au sang créée par Pfeiffer. Les auteurs qui emploient cette technique mélangent le sang à la gélose sans spécifier toujours les proportions des composants de leur milieu. Schottmüller (1899) note que les résultats obtenus varient suivant la proportion du sang par rapport à la gélose et adopte le taux invariable de 2 parties de sang défibriné pour 5 de gélose. Si la quantité de sang est trop faible le milieu est peu modifié et l'on n'observe pas d'anneau hémolytique autour des colonies streptococciques ; si la proportion du sang est trop forte, le pouvoir bactéricide du sérum peut entraver le développement des germes. Rieke, Boxer ont confirmé l'exactitude de ces remarques. Freymuth attire aussi l'attention des bactériologues sur la nécessité de suivre une technique précise pour obtenir des résultats constants. Enfin Smith et Brown (1) (1915) ont préconisé l'emploi d'une gélose au sang ainsi composée. Leur milieu contient par litre 500 gr. de viande de veau, 5 gr. de sel, 15 gr. de gélose, 10 gr. de peptone Witte ; sa réaction finale est de 0,8 à 1,2 p. 100 d'acide normal avec le phénolphtaléine pris comme indicateur. La gélose est répartie par tubes de 12 c. c. On la fait fondre au bain-marie à 45° pendant un quart d'heure, on ajoute à chaque tube 2/3 de c. c. de sang défibriné de cheval et on mélange intimement. Chaque tube estensemencé avec 1 ou 2 anses de culture en bouillon convenablement diluée, et le contenu du tube est versé dans une boîte de Petri de 9 cm. de diamètre. Le milieu contenant 5 % de sang, forme une couche épaisse de 2 mm. Après solidification, on renverse à demi-entr'ouverte, pendant 1/4 d'heure à 1/2 heure la boîte qui le contient.

(1) J. med. Research, 1915, XXXI, 455.

Brown (1) (1919) consacre un travail important à l'emploi de cette gélose au sang dans l'étude des streptocoques. Faisant varier les constituants du milieu, il obtient des colonies d'aspects différents et montre l'importance respective de divers facteurs : proportions du sang et de l'agar, origine et âge du sang, réaction du milieu, espèce animale fournisseuse de viande et marque commerciale de peptone, présence ou absence de glucose, aérobiose ou anaérobiose. Il arrive à distinguer sur ce milieu des aspects différents, par suite des types différents de streptocoques, hémolytiques (α) ou non (β ou γ). Le travail de Brown représente un progrès sérieux dans l'emploi de la gélose au sang, mais la négligence d'un point de cette technique minutieuse expose à des erreurs.

D'une façon générale, l'emploi de la gélose au sang, s'il a pour résultat la différenciation de variétés de streptocoques, convient mal à l'étude de l'hémolysine, puisqu'on est dans l'impossibilité d'isoler cette dernière, et à plus forte raison de la titrer. Les méthodes de titrage du pouvoir hémolytique sont bien fragiles qui reposent sur la mesure du diamètre de l'anneau hémolytique entourant la colonie. Aussi aurons-nous spécialement en vue les milieux liquides.

2°) MILIEUX LIQUIDES.

Ici, deux sortes de techniques, suivant qu'on ajoute le sang au milieu stérile ou à la culture déjà développée.

On peut constater l'hémolyse en ensemençant le streptocoque dans du bouillon alcalin, additionné de sang Lingelsheim (1899), note le premier l'hémolyse de streptocoque dans les milieux liquides, en ensemençant le sang d'un animal infecté dans du sang citraté de même espèce et voit se produire l'hémolyse après un séjour de 3 à 4 heures à l'étuve. Il observe également l'hémolyse en ajoutant au sang une égale quantité de bouillon. Avec un échantillon de streptocoque franchement hémolytique, on voit déjà au bout de quelques heures monter du dépôt des hématies une colonne rouge vin de Bourgogne. Si on laisse à l'étuve en agitant de temps à autre, toute l'hémoglobine a passé dans le liquide après 24 heures. Ensuite la coloration vire au rouge brun, par formation de méthémoglobine. Des techniques plus ou moins voisines ont été employées par divers auteurs, tels que Marmorek (1902), Schottmüller (1903), Silberstrom, Andrex et Horder, Baumann (1906), Rieke, Zangemeister (1909). Pour éliminer l'ac-

(1) Monog. of. the Rockefeller Inst. for Med. Research, n° 9, 1919.

tion du sérum sanguin, Kerner (1905) ajoute au milieu liquide du sang défibriné ou des hématies lavées de lapin, abandonne 3 ou 4 jours sans secouer, puis mesure le degré de l'hémolyse par la hauteur à laquelle l'hémoglobine dissoute s'élève dans le milieu limpide. Freymuth (1907), après de nombreuses recherches sur l'hémolyse dans divers milieux liquides, conclut qu'elle peut se produire dans les milieux stériles, aussi refuse-t-il toute valeur à la méthode. On peut d'ailleurs reprocher à tous ces procédés la difficulté d'ajouter au milieu du sang sûrement stérile et l'impossibilité de filtrer le pouvoir hémolytique. Aussi sont-ils abandonnés en général.

Dans les autres procédés utilisés également pour le titrage de l'hémolysine, on ajoute le sang à la *culture déjà développée*. Besredka (1901) emploie comme milieu le sérum de lapin, sérum chauffé une demi-heure à 55° ; ensemencant avec I et II gouttes de sang laqué d'un lapin qui vient de succomber, il filtre sur bougie Chamberland la culture à 37° âgée de 18 heures, diluée au demi dans l'eau physiologique ; XXIV gouttes de ce filtrat dissolvent en 2 heures à 37° I goutte de sang défibriné de lapin. Schlesinger (1904) ensemence le streptocoque dans du bouillon, ajoute après quelques jours I goutte de sang défibriné de lapin à 5 c. c. de culture, laisse 2 heures à 37°, puis une nuit à la glacière. Brown (1912) cultive le streptocoque dans du bouillon additionné au 1/10 de sérum de lapin, sérum préalablement chauffé 1/2 heure à 60°. Après 8 à 10 heures, il filtre sur filtre Reichel ou Chamberland. Pour titrer le pouvoir hémolytique, il mélange 1/2 c. cube d'une émulsion à 5 % d'hématies de lapin avec 1,5 c. cube de filtrat dilué. Mac Levi (1) (1912) cultive le streptocoque dans du bouillon franchement alcalin au tournesol, additionné de 15 à 20 % de sérum équin chauffé 1 heure à 56° ; il emploie 1 c. c. d'une émulsion de globules de bœuf à 5 % et laisse en contact le mélange 2 heures à 37°. Le pouvoir hémolytique d'un échantillon est mesuré par la dose hémolytique minimum (M. H. D.), c'est-à-dire par la plus faible quantité de culture qui hémolyse complètement en 2 heures 1 c. c. de l'émulsion globulaire. Von Hellens (2) emploie du bouillon classique faiblement alcalin au tournesol additionné de 40 à 50 % de sérum équin chauffé 30 minutes à 56° ; le bouillon additionné de liquide d'ascite au 1/3 est presque aussi favorable à la production d'hémolysine ; le bouillon additionné de sérum de lapin est moins bon, le bouillon simple encore moins bon. Pour le titrage du pouvoir hémolytique,

(1) J. Path. et Bact. 1911-12, t. 16, p. 321 et *ibid.*, 1914-15, t. 19, p. 392.

(2) Centralbl. f. Bak., Orig., t. 68, 1913, p. 602.

8 c. cubes d'émulsion à 1-2 % d'hématics lavées de cheval sont mélangés à 2 c. c. de culture ou de filtrat à des dilutions variées ; on observe l'hémolyse après séjour à 37° pendant 2 heures et à la glacière pendant une nuit. North White et Avery (1914), Lyall (1) (1914) avec des cultures, De Kruif et Ireland (1920) avec des filtrats, utilisent des techniques très voisines de la précédente.

Dans la plupart des publications, les auteurs conseillent de laisser cultures ou filtrats 2 heures en contact avec les hématics. On peut se demander si ce séjour prolongé à l'étuve ne permet pas le développement des cultures, d'où une cause d'erreur, aussi préférons-nous utiliser la technique suivante :

On emploie comme milieu de culture du bouillon Martin additionné de 1/10 de sérum équien non chauffé, stérilisé par filtration sur bougie Chamberland. On enseme en partant d'une culture dans le même milieu et on emploie la culture totale développée à 37°. L'expérience nous a montré que les cultures âgées de 7 à 8 heures sont préférables le plus souvent, — pas toujours cependant, comme on le verra plus loin. On utilise pour la recherche de l'hémolyse des hématics de mouton lavées 2 fois et émulsionnées dans l'eau physiologique, au taux de 10 p. 100 des quantités décroissantes de culture sont mélangées et une quantité fixe (1 c. cube) d'émulsion globulaire. On complète 52 c. c. avec du milieu de culture stérile. On place les tubes au bain-marie à 35° et on fait la lecture au bout d'une heure.

Numéros des tubes	Nombre de gouttes de culture	Nombre de gouttes de bouillon-sérum neuf	Emulsion à 10 % d'hématics de mouton, dans l'eau physiologique
1	XX	0	1 c. cube
2	XV	V	id.
3	X	X	id.
4	VIII	XII	id.
5	VI	XIV	id.
6	IV	XVI	id.
7	II	XVIII	id.
8	I	XIX	id.

Il nous a paru avantageux de limiter à une heure le temps de contact, pour éviter une multiplication secondaire des cultures. Les cultures totales sont préférables aux filtrats ; la filtration étant capable d'affaiblir le titre hémolytique dans une mesure impossible à prévoir. Enfin, on aura soin de placer les tubes d'expérience au bain-marie pour les porter rapidement à la température de 35°.

Nos recherches ont été effectuées avec 40 échantillons de streptocoque d'origine pathologique. La plupart nous ont été remis par nos amis Truche et Lévy-Brühl, que nous sommes heureux de remercier ici de leur obligeance. Parmi ces 40 échantil-

(1) J. Med. Research, 1914, t. 30, p. 488.

(2) J. inf. Dis., 1920, t. 26, p. 285.

lons, 22 ont été isolés chez l'homme au cours d'affections diverses (otite compliquant ou non la scarlatine, mastoïdite, méningite, angine, endocardite maligne, infection puerpérale, broncho-pneumonie, anasarque, pleurésie, pyelonéphrite, abcès, etc.). 15 autres ont été prélevés dans la moelle osseuse à l'autopsie d'oiseaux, poules, le plus souvent ayant succombé à des affections diverses. Un échantillon provient d'une infection streptococcique spontanée de lapin et deux autres ont été trouvés à l'autopsie de cobayes inoculés avec du virus aphteux. Sur ces 40 échantillons, 28 se montrent hémolytiques pour les hématies de mouton, 12 n'ont pas fourni d'hémolysine même dans les conditions reconnues les plus favorables à la production de cette dernière. Notons que streptocoques humains et aviaires peuvent les uns et les autres se montrer hémolytiques ou non. Remarquons encore que les germes franchement virulents pour la souris et le lapin ont été rencontrés exclusivement dans le groupe aviaire. Ce dernier est loin d'ailleurs de ne compter que des échantillons pathogènes ; mais seulement 5 sur 15. Nous reviendrons à la fin de ce travail sur les relations qui existent entre le pouvoir hémolytique et la virulence des streptocoques. Les données précédentes ressortent de l'examen du tableau page 36.

Nous n'avons retenu pour notre étude que les échantillons pour lesquels s'imposait, sans hésitation possible, le diagnostic de streptocoques. Il s'agissait de cocci colorés par la méthode de Gram, poussant agglutinés plus ou moins énergiquement dans le bouillon Martin, se disposant dans ce milieu en chaînettes de longueurs variables insolubles dans les sels biliaires. C'est avec intention que nous citons d'abord les caractères *nécessaires*. Quant aux autres, rencontrés dans l'étude de ces échantillons, il n'en est pas de constant, au sens strict du mot. La plupart de nos échantillons fournissent sur la gélose Martin, glucosée à 2 p. 1000 ou sur la gélose au milieu T (1), des colonies petites, régulièrement arrondies, incolores, transparentes, devenant ensuite plus ou moins volumineuses et présentant une surface plissée, un bouton central et des bords dentelés. A signaler que dans les cultures sur milieux solides, les chaînettes sont exceptionnelles. On observe de préférence de cocci ronds ou ovales, isolés ou groupés en diplocoques et en amas. Rappelons encore qu'on peut, dans des cultures sur milieux solides, même âgées de moins de 24 heures, rencontrer des formes bacillaires en massues, qui feraient douter de la pureté de la culture un observateur non averti. Ces formes

(1) Ann. Inst. Pasteur, 1911, p. 480.

ont été vues par plusieurs auteurs, Kermorgant (1) les a récemment décrites (1920). Dans les cas douteux on recourt avec avantage à l'examen microscopique des milieux liquides : en prélevant, sans agiter les tubes dans le dépôt microbien, on trouve les chaînettes plus caractéristiques. Tous les échantillons que nous avons observés, croissent à 40° aussi bien qu'à 37°. A 22°, certains échantillons ne poussent pas dans la gélatine. Tous coagulent le lait à 37°, presque toujours rapidement en 18 à 36 heures, et se développent abondamment dans l'eau peptonisée lactosée à 1 % sans dégager de gaz. Un caractère important très répandu parmi les streptocoques est leur grande résistance à l'autolyse.

(1) C. R. Soc. Biol., t. 87, 1922, p. 642.

CONDITIONS DE PRODUCTION DE L'HEMOLYSE

Passons brièvement sur les *milieux solides*, qui se prêtent assez difficilement à des expériences sur l'hémolysine. Les corps microbiens récoltés sur *gélose-ascite* ou *gélose-sérum* émulsionnés en bouillon-sérum, se montrent dénués de pouvoir hémolytique. Sans doute l'hémolysine diffuse au sein du milieu, puisque les colonies sur gélose au sang s'entourent d'une claire hémolytique. D'ailleurs cette hémolysine doit être moins abondante que dans les milieux liquides, le développement microbien des streptocoques se montrant relativement maigre sur milieux solides. Quant à la *gélose au sang*, son emploi nécessite, comme le montrent les recherches détaillées de Brown, les précautions techniques minutieuses ; faute de les observer, on risque de laisser passer l'existence du pouvoir hémolytique. La production d'un anneau clair d'hémolyse plus ou moins étendu autour de la colonie streptococcique paraît lié à deux conditions : l'issue de l'hémoglobine hors des globules et sa diffusion dans l'épaisseur de la gélose. Si l'on ensemence le streptocoque sur la gélose additionnée de sang préalablement laqué et centrifugé (solution d'hémoglobine), on n'observe pas d'anneau hémolytique. Si les colonies sont trop confluentes, les anneaux manquent également, la diffusion de l'hémoglobine dans le milieu s'opérant avec peine.

Les *milieux liquides* se prêtent beaucoup mieux à l'étude de l'hémolysine. Tous les auteurs accordent la préférence aux milieux additionnés d'humeurs (sérum de diverses espèces animales, liquide d'ascite). Nous nous sommes arrêtés à l'emploi du bouillon Martin additionné de 1/10 de sérum équín frais. La proportion optimum de sérum, l'utilité ou non de l'inactivation du sérum, l'espèce animale à laquelle il est emprunté, sont autant de points discutés. Mac Leod (1912) observe le maximum de pouvoir hémolytique dans les cultures en bouillon-sérum humain ou mieux encore équín, le sérum étant chauffé 1 heure à 56° et ajouté au bouillon dans la proportion de 10 à 50 %, mieux encore de 15 à 20 %. Von Hellens (1913) utilise du bouillon additionné dans la proportion de 40 à 50 % de sérum équín chauffé 1/2 heure à 56° ; les résultats ont été aussi bons avec le bouillon-ascite,

inférieures avec le bouillon-sérum inactivé de lapin à 10 %, médiocres avec le bouillon simple. Lyall emploie le bouillon-ascite peptoné à 2 %. De Kruif et Ireland (1920) ont consacré une longue étude à la recherche du meilleur milieu. Ils concluent à l'adoption du bouillon additionné à 20 % de sérum équin inactivé ; les sérums équin et ovin sont équivalents, le sérum équin est supérieur au sérum humain, plus encore au sérum de lapin. A la concentration de 20 %, les sérums humain, équin et ovin leur paraissent également bons et le chauffage indiqué. On ne constate donc pas d'accord entre les auteurs sur la composition du milieu optimum. Les résultats des recherches minutieuses de De Kruif et Ireland ne seraient-ils valables que pour l'unique échantillon de streptocoque qu'ils ont employé. Pour notre part, nous n'avons pas, chez 3 échantillons spécialement examinés à ce point de vue, constaté de différences importantes dans le pouvoir hémolytique des cultures âgées de 8 heures, qu'elles soient faites en bouillon-sérum équin tel quel ou inactivé ajouté au bouillon dans la proportion de 10 ou de 20 %.

Nous n'avons pas observé de différences dans le pouvoir hémolytique des cultures *aérobies* ou *anaérobies*, et plusieurs auteurs ont déjà fait la même remarque.

L'influence des *sucres* sur le pouvoir hémolytique des cultures est un des points les plus discutés. Nous avons pendant un certain temps employé le milieu T (1), de préparation simple et rapide et constaté que beaucoup d'échantillons de streptocoque s'y montraient hémolytiques. Mais en reprenant à l'aide du bouillon-sérum équin l'étude de tous les échantillons, nous avons vu certains d'entre eux hémolyser exclusivement dans ce dernier milieu. Cette particularité était d'autant plus frappante qu'en milieu T le développement microbien est souvent plus riche. Le glucose exerce-t-il une influence nocive sur l'hémolyse ? La question est depuis longtemps à l'étude. E. Sachs (2) (1909) croit que les méthodes en bouillon glucosé à 1 % demeurent hémolytiques moins longtemps, le streptocoque y périssant plus vite par l'acidité du milieu qui produit l'attaque du glucose. Kuhn (2) (1912) suppose que le métabolisme du streptocoque est modifié radicalement en présence de sucre. Lyall (1914), examinant l'acidité et le pouvoir hémolytique, après 18 heures, des cultures en bouillon-ascite additionné de sucres divers à 1 %, constate que le plus souvent le sucre gêne l'hémolyse ; cependant tous les sucres ne

(1) Ann. Inst. Pasteur, 1911, p. 480.

(2) Central. f. Bak., Orig. I, 1912, t. 63, p. 97.

seraient pas inhibiteurs pour un échantillon de streptocoque donné ; le dextrose est le plus inhibiteur et ce pouvoir empêchant ne paraît pas en rapport avec le degré de l'acidité. Brown (1919) pense qu'en présence d'un sucre fermentescible, le métabolisme azoté du streptocoque est réduit au minimum, aussi la production d'hémolysine est-elle restreinte ou empêchée. D'après Stevens et Koser (1) (1919), l'hémolysine apparaît plus tard, disparaît plus tôt et se montre moins abondante dans le bouillon dextrosé à 1 % que dans le bouillon simple. En présence de sucres fermentescibles, le streptocoque utilise plus de substances hydrocarbonées et moins de protéines. L'acide développé diminue la vitalité de la culture et la protéolyse, et détruit l'hémolysine à la température de l'étuve. Cook, Mix et Culvyhouse (2) (1921) ont vu également que l'addition, au taux de 1 % de sucres fermentescibles, retarde l'apparition de l'hémolysine qui est moins abondante, et hâte sa disparition. Avec des doses inférieures à 1 %, il n'y a pas d'inhibition de l'hémolyse. Ces auteurs fournissent la preuve que l'inhibition n'est pas due à la simple présence du glucose, mais à son action sur la formation de l'hémolysine. L'acidité est le facteur d'inhibition le plus important, puisque la neutralisation continue des acides par addition de phosphates, prolonge la durée du pouvoir hémolytique ; d'autre part, la neutralisation de l'acidité d'un filtrat de culture glucosée restitue au milieu la faculté de produire de l'hémolysine.

La *température* du développement influe également sur la production de l'hémolysine. Nous donnerons comme preuve les courbes figurant au tableau ci-joint. Elles expriment le pouvoir hémolytique d'un échantillon de streptocoque cultivé en milieu T aux températures respectives de 40°, 37°, 33° et 24°. C'est à 37° et à 40° qu'apparaît et disparaît le plus vite l'hémolysine. A 37°, la culture est franchement hémolytique à la 4^e heure ; à la 5^e heure, le pouvoir hémolytique n'est pas éloigné de son maximum qui est atteint vers la 7^e heure. Il baisse rapidement à partir de la 10^e heure et a disparu vers la 16^e. A 40°, disparition plus précoce encore. A 33°, le développement microbien est plus lent, le pouvoir hémolytique atteint son maximum vers la 8^e heure et baisse beaucoup plus lentement qu'à 37° et à 40° ; à la 16^e heure la culture demeure hémolytique. A 24°, où le développement est encore plus lent, la courbe demeure plus basse.

Pour la plupart des autres échantillons que nous avons examinés, le maximum du pouvoir hémolytique s'observe à partir

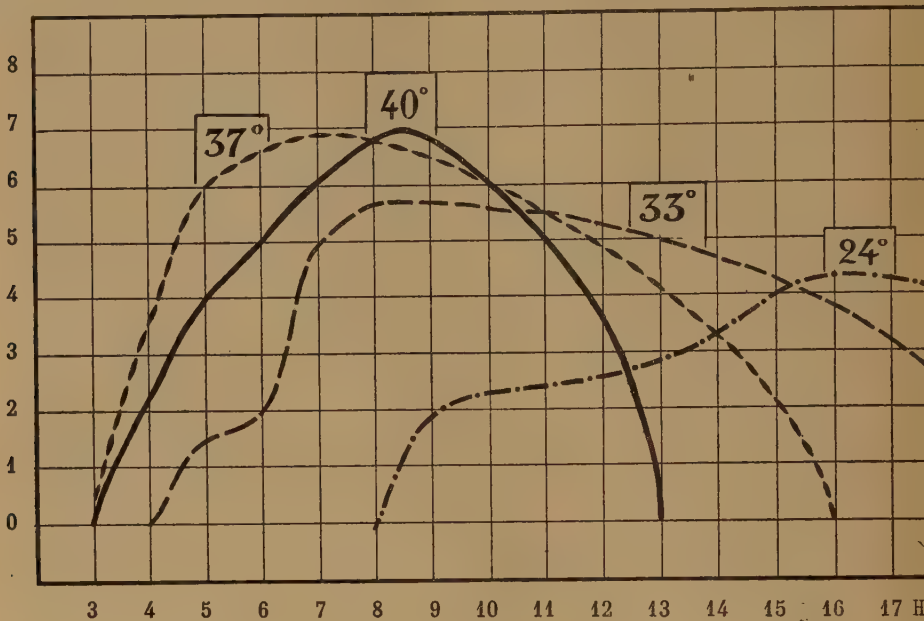
(1) J. Exp. Med. 1919, t. 30, p. 539.

(2) J. inf. Dis., t. 28, 1921, p. 93.

Courbes du pouvoir hémolytique de l'échantillon MAURICE

entre la 3^e et la 18^e heure (cultures en bouillon Martin sérum équin à différentes températures)

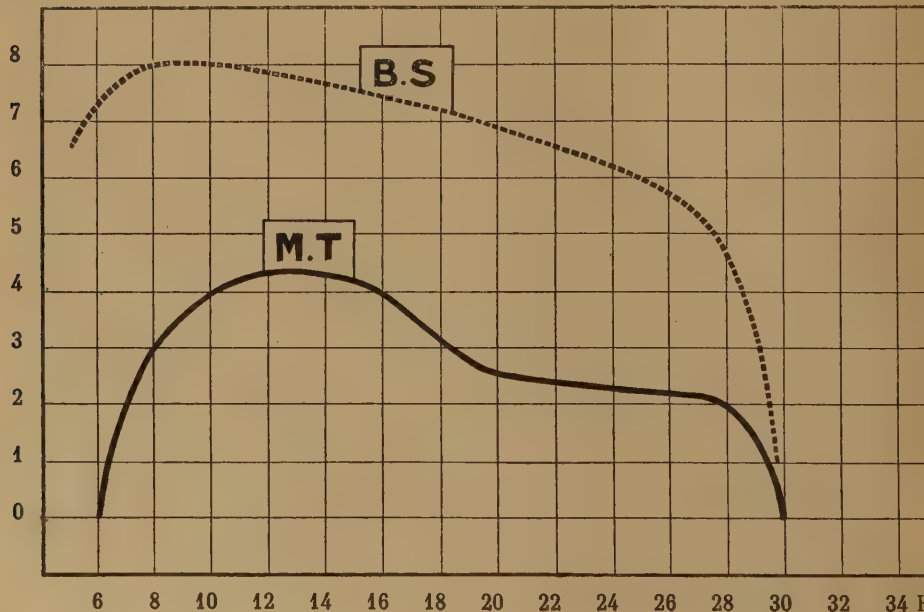
Tubes



Courbes du pouvoir hémolytique de l'échantillon BAR

entre les 6^e et 30^e heures (cultures en bouillon Martin sérum équin et le milieu T à 37°)

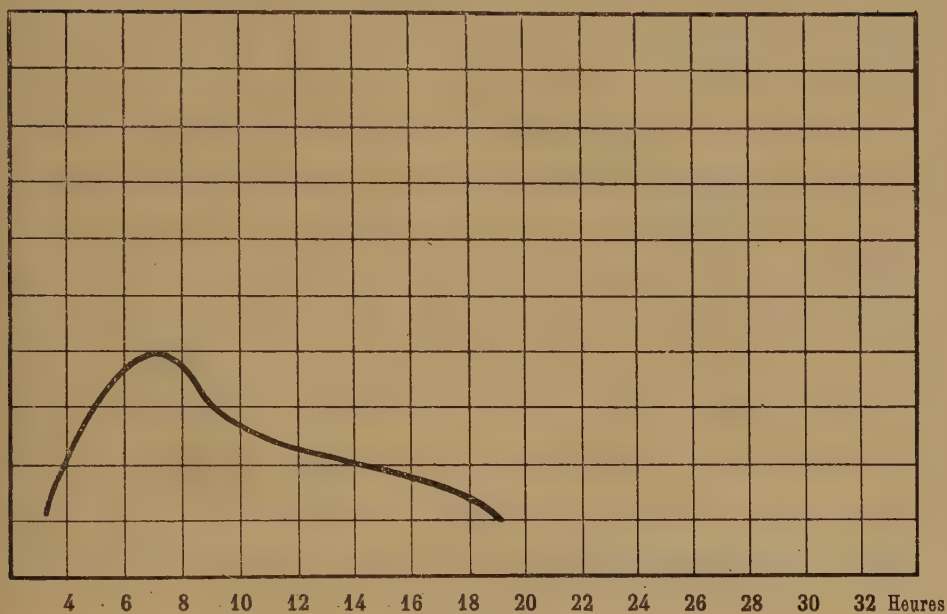
Tubes



Courbe du pouvoir hémolytique de l'échantillon LEBIGRE

entre les 4^e et 20^e heures (culture en milieu T à 37°)

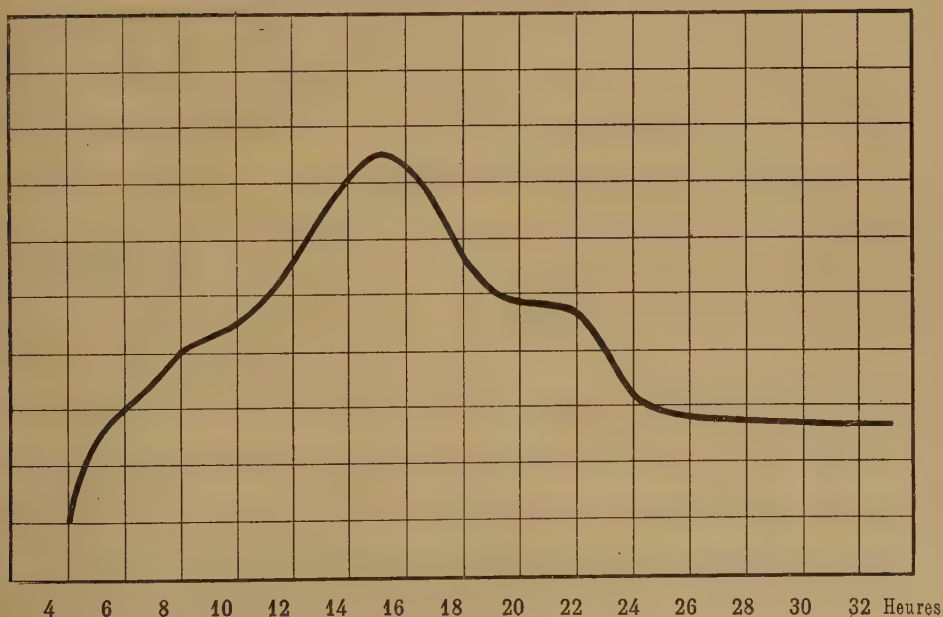
ubes



Courbe du pouvoir hémolytique de l'échantillon NETTER

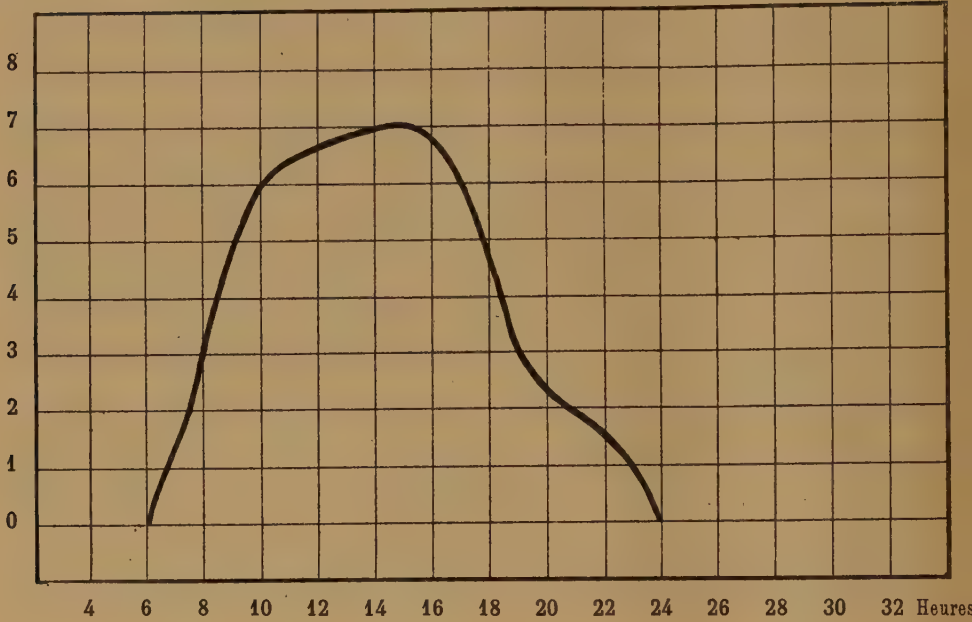
entre les 4^e et 32^e heures (culture en milieu T à 37°)

ubes



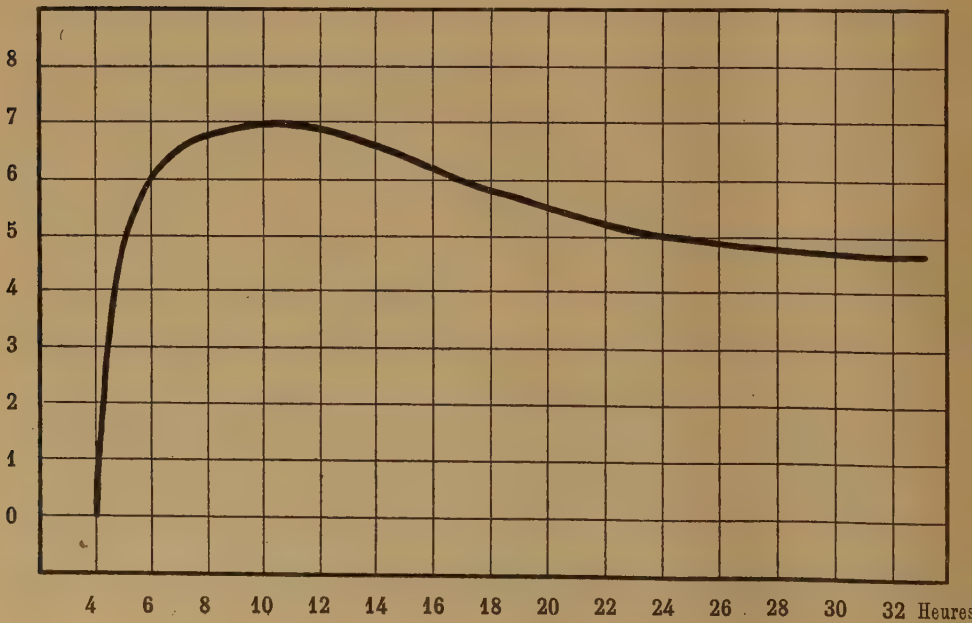
Courbe du pouvoir hémolytique de l'échantillon PION
entre les 6^e et 24^e heures (culture en milieu T à 37°)

Tubes



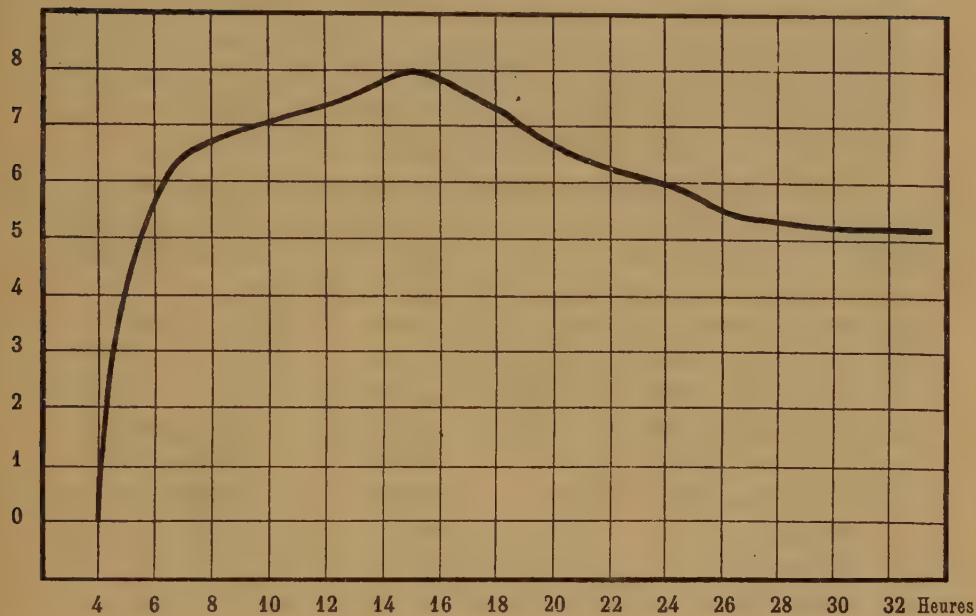
Courbe du pouvoir hémolytique de l'échantillon VIR
entre les 4^e et 32^e heures (culture en milieu T à 37°)

Tubes



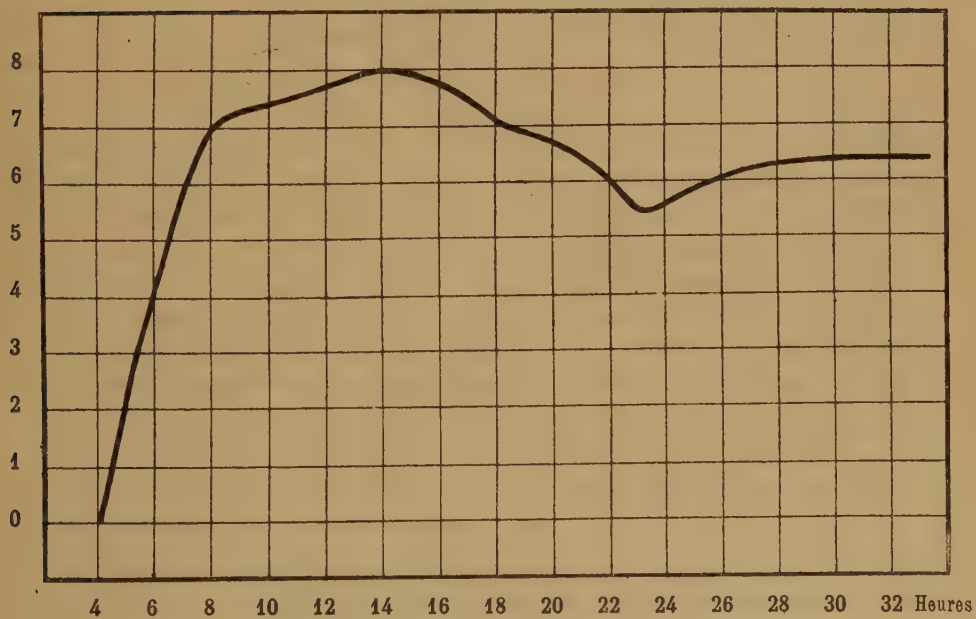
Courbe du pouvoir hémolytique de l'échantillon CAILLAT
entre la 4^e et 32^e heure (culture en milieu T à 37°)

Tubes



Courbe du pouvoir hémolytique de l'échantillon MIL
entre la 4^e et 32^e heure (culture en milieu T à 37°)

Tubes



de la 8^e heure environ, dans les cultures à 37°, mais il est important de pratiquer l'ensemencement dans des conditions favorables, sous peine de n'obtenir à la 8^e heure qu'une culture peu ou pas hémolytique. Le mieux nous paraît être d'ensemencer le streptocoque 2 fois à 12 heures d'intervalle et d'utiliser seulement pour l'hémolyse la 3^e culture qu'on aura eu soin d'ensemencer dans le milieu préalablement chauffé à 37°.

On ne rencontre dans la littérature que peu de précisions sur le moment le plus convenable à la recherche du pouvoir hémolytique dans une culture. Ce point particulier est cependant d'une grande importance pratique. Mac Leod (1912) parle de cultures de 8 à 12 heures, von Hellens (1914) décele de l'hémolysine dans les cultures âgées d'une heure, mais observe le maximum entre 7 et 8 heures ; après 8-13 jours, l'hémolysine a disparu ; on en retrouve parfois dans les cultures âgées de 3 à 4 semaines, il s'agit ici de cultures en bouillon additionné de sérum inactivé, enfin de préférence à 40-50 %. L'examen d'un certain nombre d'échantillons nous a montré, qu'en milieu T, la courbe du pouvoir hémolytique diffère suivant les échantillons examinés. Chacun des échantillons étudiés a été cultivé à 37° dans un ballon de 80 c. c. de milieu T et des prélèvements ont été opérés à des stades variés de développement microbien ; les courbes ci-jointes résument les résultats observés. A noter que sur 2 échantillons de streptocoque examinés à la fois en milieu T et en bouillon-sérum équin, les courbes de l'hémolysine variaient peu pour l'échantillon Maurice, mais sensiblement pour l'échantillon Bar.

En milieu T, les échantillons Lebigne et Maurice présentent leur maximum de pouvoir hémolytique vers la 7^e heure, puis ce pouvoir baisse déjà à partir de la 3^e heure et disparaît entre la 16^e et la 19^e : ici, apparition et disparition rapides. Les échantillons Netter et Pion offrent des courbes différentes des précédentes : le pouvoir hémolytique faible à la 8^e heure n'atteint son maximum qu'à la 15^e, baisse entre la 15^e et la 19^e et se montre faible ou nul à la 30^e : ici, apparition tardive du maximum et durée plus longue de l'hémolyse. Les échantillons Vir et Caillat diffèrent encore du type précédent : le maximum apparaît dès la 7^e heure mais le pouvoir hémolytique persiste aussi accentué à 30 heures ; à la 67^e heure, il a disparu : ici, maximum précoce, plateau, et lente disparition. La lecture des courbes montre que les autres échantillons étudiés en milieu T offrent autant de types divers.

Il s'agit, pour les courbes précédentes d'échantillons, de streptocoques étudiés en milieu T, c'est-à-dire glucosé à 2 p. 1000.

Une fois vérifiée la supériorité du bouillon-sérum équin pour la production de l'hémolysine, nous sommes définitivement arrêtés à l'emploi exclusif de ce milieu.

Un point important à retenir en pratique est que les divers échantillons offrent leur maximum de pouvoir hémolytique à des stades divers du développement, les uns vers la 8^e heure, les autres vers la 15^e ; d'où nous concluons que dans l'étude d'un échantillon de streptocoques il est indispensable de rechercher la propriété hémolytique à ces deux âges de la culture avant d'affirmer qu'elle est absente.

CARACTÈRES DE L'HEMOLYSINE

in vitro

Lorsqu'on cherche à réunir ces caractères d'après les travaux des auteurs, on rencontre souvent des opinions contradictoires.

Tout d'abord, où est située l'hémolysine dans les cultures ? Il importe de spécifier quel milieu on emploie, les choses se présentant différemment avec le milieu T et le bouillon-sérum équin. Les centrifugats des cultures en milieu T, prélevés à des heures variées du développement microbien, ne se sont jamais montrés hémolytiques, tandis que les cultures totales correspondantes hémolysaient énergiquement. Le culot microbien de centrifugation d'une culture hémolytique réémulsionné dans le milieu T neuf ayant servi à la culture est presque aussi hémolytique que la culture totale. Si l'hémolysine existe à un moment donné dans le milieu T, il est impossible de l'y déceler. Cultive-t-on au contraire les mêmes échantillons en *bouillon-sérum*, les *centrifugats se montrent hémolysants* comme les cultures totales. Jupille (1) a signalé, autrefois, de rares échantillons hémolytiques ne cédant presque pas d'hémolysine au bouillon-sérum.

La *filtrabilité* de l'hémolysine a été aussi l'objet de discussions nombreuses. Besredka (1901) constate que les cultures en sérum de lapin, sérum chauffé 1/2 heure à 56°, étendu d'eau physiologique à parties égales, fournissent après filtration sur bougie Chamberland une hémolysine active. D'après MacLeod, les filtrats de culture en bouillon simple sur filtre Maassen sont 20 fois moins actifs que les cultures, 2 et 3 fois moins actifs quand on opère avec des cultures en bouillon-sérum ; les filtrats sur 10 premiers c. cubes qui traversent la bougie étant moins actifs filtre Berkfeld sont 5 fois moins actifs que les cultures, les 5 à 10 premiers c. cubes qui traversent la bougie étant moins actifs que le reste. Nos expériences personnelles nous ont montré des résultats variables suivant les filtrations ; sur bougie Berkfeld, des cultures en bouillon-sérum âgées de 8 heures, nettement hémolytiques, ont fourni des filtrats tantôt aussi actifs que les cultures, tantôt très affaiblis, mais lorsqu'on prend soin de laisser en contact la bougie et le liquide avant de commencer la filtration, les

(1) Ann. Inst. Pasteur, 1911, t. 25, p. 918.

premiers centimètres cubes recueillis peuvent être aussi actifs que celle de 37°, l'hémolyse s'effectuant plus lentement.

Sa température optimum d'activité est 37° d'après Besredka : elle n'agit pas à 0° ; la température de 26° est moins favorable les suivants. L'hémolysine est donc filtrable.

L'hémolysine est détruite par le chauffage. Ici encore les résultats des auteurs diffèrent. D'après Besredka, dont les recherches sont faites avec les cultures *sérum de lapin*, le pouvoir hémolytique résiste au chauffage 1/2 heure à 56°, il est affaibli après une 1/2 heure à 65°, détruit après 2 heures à 70° et 10 heures à 55°. Mac Leod (1912) donne les chiffres suivants : l'hémolysine est affaiblie après chauffage de 30 minutes à 49°, détruite après 30 minutes à 55°, très affaiblie après 2 h. 30 à 37° ou 15 heures 24°, puis baisse ; les recherches de Mac Leod sont faites en bouillon *sérum équin*. Von Hellens (1914) trouve des chiffres différents pour un même échantillon de streptocoque, suivant l'espèce de sérum ajouté, en proportions d'ailleurs très inégales, au bouillon de culture : il faut 20 heures à 37° pour détruire l'hémolysine dans le bouillon *sérum équin* (1+1) 9 heures dans le bouillon-*sérum de lapin* (1+9), 6 à 7 heures dans le bouillon-*ascite* (1+2) : Besredka avait noté que l'hémolysine varie quantitativement et qualitativement avec l'espèce animale fournissant le sérum employé pour la culture. Les résultats *variables* des auteurs s'expliquent peut-être par les *différents* milieux de culture et les *différentes* techniques de mise en évidence de l'hémolyse. D'après nos constatations personnelles, les germes étant cultivés à 37° dans le bouillon *Martin-sérum équin*, voici des temps de chauffage au bout desquels est détruit l'hémolysine d'un échantillon : 10 minutes à 70°, 30 minutes à 56° (1), 1 heure à 45°, 2 heures à 37°. Elle résiste au contraire 15 minutes à 45°, 30 minutes à 44°, 1 heure à 37°, 92 heures à 4°.

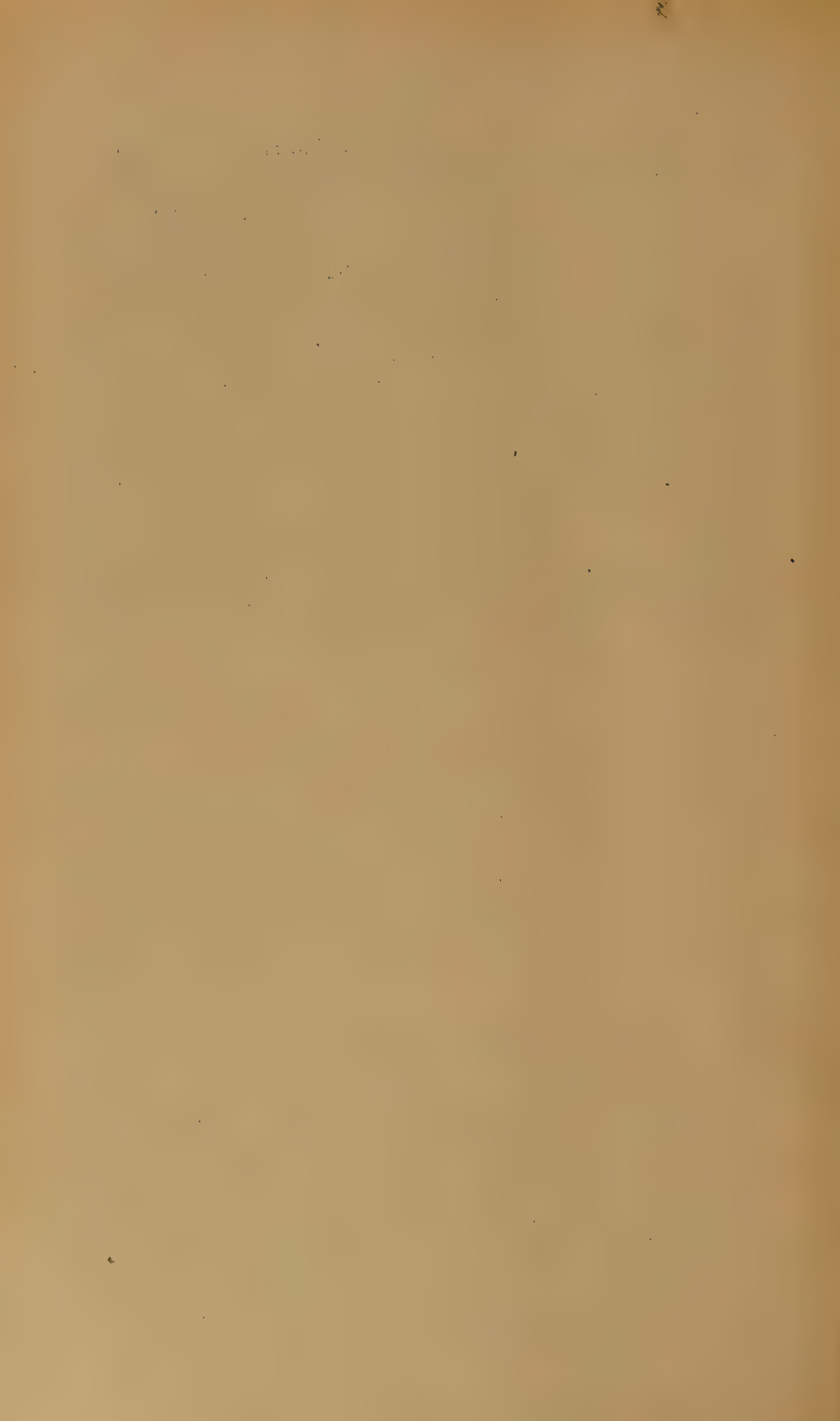
L'hémolysine est détruite par la *digestion peptique* d'après Ruediger (2), par certains *antiseptiques*, aldéhyde formique, acide phénique et d'après Lingelsheim par le chloroforme, le toluène. Nous n'avons pas réussi à confirmer les résultats de von Hellens qui aurait constaté la solubilité dans l'éther de l'hémolysine du bouillon-*sérum*, et sa résistance 10 minutes à 100° dans l'extrait éthéré. Un liquide clair où l'on fait barboter de l'air pendant quelques minutes, à la température du laboratoire, ne présente pas de baisse du pouvoir hémolytique. L'hémolysine chauffée 30 minutes à 58°

(1) Ce chiffre a été vérifié pour deux autres échantillons.

(2) J. Am. Med. Assoc., 1903, t. 41, p. 962 et J. Inf. Dis., 1907, t. 4, p. 277.

n'est pas réactivée par l'addition d'un liquide clair actif, comme nous l'avons constaté ni par l'addition de sérum neuf (Besredka).

De nombreux auteurs ont étudié le *pouvoir hémolytique des streptocoques vis-à-vis des hématies de diverses espèces animales usuelles*. Dans un certain nombre de recherches, on incorpore le sang à la gélose et aboutit à des résultats variables, certaines différences de pouvoir hémolytique étant constatées vis-à-vis des différents globules, mais ces différences ne paraissent pas en général très importantes. D'ailleurs il est difficile de fonder une classification solide sur l'emploi de la gélose au sang, milieu où l'aspect de l'hémolyse dépend de trop nombreux facteurs (Brown). Avec l'emploi de bouillon-sang, les auteurs ne sont pas arrivés davantage à établir des différences tranchées suivant les espèces animales. 3 échantillons de streptocoques hémolytiques pour les hématies de mouton à la 7^e heure du développement en bouillon-sérum, ne nous ont montré aucune différence importante dans leur pouvoir hémolytique examiné vis-à-vis des hématies d'homme, de cheval, de bœuf, de porc, de lapin, de cobaye.



L'HEMOLYSINE *in vivo*

Les lapins inoculés avec des cultures de streptocoques très virulents et très hémolytiques présentent des lésions tout à fait caractéristiques sur lesquelles Knorr (1893) a le premier attiré l'attention. Marmorek (1895) les mentionne brièvement ; Bordet (1897) les a décrites, ainsi que Lingelsheim. Nous les avons de nouveau observées avec des échantillons aviaires de streptocoques, dont l'un (échantillon Bonot), tuait, au moment de son isolement, le lapin sous la peau à la dose de 10⁻⁹ cent. cube de culture liquide, en 2 jours et demi. A l'autopsie des lapins, on note la présence de plaques rouge vif, suivant le trajet des gros vaisseaux sous-cutanés ; le sang hémolysé s'observe au niveau de la plèvre, du péricarde, du péritoine, des cavités cardiaques ; le foie est friable, rose saumoné, la rate et les reins d'un rouge sombre ; la surface des poumons est le siège de nombreuses pétéchiés. Des lésions hémolytiques analogues sont constatables à l'autopsie des souris, des cobayes, des poules. D'après Bordet, chez le lapin, ces altérations apparaissent *pendant l'agonie seulement* (1) ; elles n'existent pas quand pour une cause quelconque l'animal meurt avec un nombre relativement restreint de streptocoques dans le sang. Besredka, nous-même, avons vu ces lésions manquer chez certains lapins, et il ne nous est jamais arrivé de les constater chez des souris sacrifiées dans des délais variés à partir de l'inoculation, nous n'avons pas davantage observé chez les lapins *pendant la vie* l'aspect laqué du sang. Il est donc presque certain que ces altérations se produisent seulement pendant l'agonie ou après la mort. Nous devons cependant mentionner que Brefon (2) aboutit à des conclusions opposées. Le sérum de lapin inoculé présente parfois dès la 10^e heure avant la mort un aspect laqué, hémolyse les hématies du lapin neuf et plus facilement encore ses propres hématies. Peut-être cette expérience n'est-elle pas à l'abri de toute critique ; il faudrait en effet s'assurer que le sérum ne contient pas de streptocoques capables à eux seuls d'hémolyser.

A côté de ces expériences sur l'action *in vivo* de l'hémolysine produite *in vivo*, se rangent d'autres expériences sur l'action *in vivo* de l'hémolysine produite *in vitro*. Mac Leod et Mac Nee (3)

(1) C'est nous qui soulignons.

(2) C. R. Soc. Biologie, 1903, t. 55, p. 886.

(3) J. of. Path. and. Bact., 1913, t. 17, p. 524.

(1913) injectent au lapin des filtrats de cultures de 18 heures en bouillon-sérum d'un échantillon de streptocoque franchement hémolytique. Les lapins se montrent d'une sensibilité très inégale à l'injection intraveineuse des filtrats, aussi cherchent-ils avant l'expérience, à explorer la sensibilité des animaux; mélangeant sérum de lapin et filtrat hémolytique; ils constatent que les sérums de certains animaux empêchent l'hémolyse. Ils injectent dans les veines des lapins sensibles des doses de 30 c. c. réparties en 3 jours consécutifs et observent une hémoglobinurie très intense dans les 2 heures suivant l'injection, et donc diminution très notable du nombre des globules rouges. A l'autopsie d'un des lapins, la réaction de l'hémosidérine était positive dans la rate, le foie et les reins. Quant aux lapins moins sensibles, ils n'ont pas présenté d'hémoglobinurie, mais une simple anémie, d'intensité variable. L'injection de filtrat chauffé 2 heures à 37°, ne détermine aucun des symptômes précédents. A noter que la dose de filtrat qui hémolyse *in vitro* 10 à 15 c. c. de sang de lapin n'hémolyse plus chez le lapin qu'une dose dix fois plus faible.

Ces expériences nous ont paru intéressantes à confirmer. Nous avons choisi l'échantillon de streptocoque aviaire Maurice, franchement hémolytique et très pathogène pour le lapin: 11 gouttes de filtrat de culture en 7 heures en bouillon-sérum à 37° hémolysaient complètement en 1 heure à 35°, 1 c. c. d'émulsion globulaire de mouton diluée au 1/10^e dans l'eau physiologique; le lapin et la souris succombaient en 2 jours et demi et 1 jour et demi à l'injection sous-cutanée de 10⁻² cent. cube de culture. La stérilité du filtrat étant vérifiée, nous avons injecté dans la veine de lapins, de 2 à 3 kilos (2.300 gr., en moyenne) des quantités de filtrats variant entre 30 c.c. et 45 c.c. réparties en 3 injections dans l'espace de 10 jours. Sur 4 lapins, l'un est mort par hypersensibilité au sérum équin; les 3 autres ont résisté. De ces animaux, un seul a présenté de l'hémoglobinurie dans les 4 heures qui ont suivi l'injection. 3 témoins injectés avec des doses semblables de filtrat auquel un séjour d'une nuit à 37° avait fait perdre son pouvoir hémolytique, n'ont pas présenté d'hémoglobinurie. Sur 3 souris ayant reçu chacune 1/2 c. c. de filtrat hémolytique dans une veine de la queue, une seule a présenté de l'hémoglobinurie à la 2^e et à la 3^e heure après l'injection, et a survécu.

Ces expériences paraissent donc confirmer celles de MacLeod et Mac Nee sur la sensibilité inégale de lapin à l'hémolysine.

EXISTE-T-IL UNE ANTISTREPTOLYSINE ?

De nombreux auteurs ont cherché à mettre en évidence une antistreptolysine dans les humeurs des sujets traités par les cultures ou les filtrats de streptocoques hémolytiques. Cette antistreptolysine existe tout d'abord d'après Mac Leod (1912) dans les sérums *normaux* d'homme, de lapin et de cobaye. Von Hellens (1913) ne l'a pas décelée en quantité notable dans les sérums de l'homme et de diverses espèces animales (bœuf, cheval, mouton, chèvre, chien, lapin, pigeon, cobaye, porc). Dans nos expériences personnelles, 11 gouttes de filtrat de l'échantillon Maurice (cultures de 7 heures), hémolysent en 1 heure à 35° 1 cent. cube d'émulsion à 10 % d'hématies de mouton. Si on ajoute 11 gouttes de sérum normal de lapin (inactif), à III à VIII gouttes de filtrat (le chiffre varie suivant les expériences) et si on laisse 1/2 heure en contact avant l'addition des hématies, l'hémolyse n'a plus lieu.

Presque tous les auteurs qui ont cherché à produire une antistreptolysine ont échoué. Besredka (1901) a traité le lapin, le mouton ; Ruediger (1907), le lapin, la chèvre, la poule ; Mac Leod (1912) a examiné des animaux de laboratoire, des chevaux utilisés pour la préparation de sérum antistreptococcique, des malades atteints d'affections dues au streptocoque hémolytique ; von Hellens (1913) a fait des recherches sur la chèvre, le cobaye : seul Breton (1) (1903), au cours d'expériences critiquées d'ailleurs par Besredka (2) et Mac Leod, aurait trouvé légèrement antihémolytique le sérum de lapins traités par des sérums de même espèce provenant d'animaux infectés.

Nous avons tenté nous-même à plusieurs reprises d'obtenir une antistreptolysine. Une première série de lapins a reçu un filtrat hémolytique provenant de cultures de 7 heures à 37° de l'échantillon Maurice. Rappelons que 11 gouttes de ce filtrat dissolvent en 1 heure à 35°, 1 cent. cube d'émulsion globulaire de mouton diluée au 1/10°. Les inoculations ont été faites suivant les animaux par voie veineuse, sous-cutanée ou musculaire. Les doses totales

(1) C. R. Soc. Biologie, 1903, t. 55, p. 887.

(2) Bull. Inst. Pasteur, 1903, p. 537.

de filtrat administré ont varié entre 20 et 110 cent. cubes, le traitement durant un mois environ chez certains sujets. Voici le protocole résumé d'une expérience chez un lapin traité dans les veines : 28 avril : 10 cent. cubes; 29 avril, 10 ; 5 mai, 10 ; 6 mai, 10 ; 13 mai, 20 ; 19 mai, 20 ; 25 mai, 10 ; saignées le 11 mai, après la 4^e injection et le 2 juin, après la 7^e. Plusieurs animaux de cette première série ont succombé, pendant le traitement, à des infections intercurrentes. Les sérums des autres n'ont pas montré de propriétés antihémolytiques plus accusées que les sérums de lapins normaux. Remarquons que le filtrat du même échantillon utilisé comme antigène a été employé pour la recherche du pouvoir antihémolytique.

Même résultat négatif dans le sérum de nos lapins qui ont reçu des quantités massives de filtrats pour la production de l'hémoglobinurie décrite par Mac Leod et Mac Nee; nos recherches sur ce point particulier ont été rapportées plus haut.

Une 3^e série de lapins a été traitée par des corps microbiens de l'échantillon Maurice desséchés 24 heures à 45°. Mis à part, les animaux qui ont succombé, 2 lapins ont reçu l'un dans les veines 15 cgr. en un mois, l'autre 30 cgr. dans les muscles pendant le même temps, sans que leurs sérums se montrent plus antihémolytiques.

Enfin dans une 4^e série, des lapins ont reçu sous la peau un mélange, à volumes égaux, de cultures liquides au même échantillon et d'une solution de ricinoléate de soude à 0,2 p. 100 dans l'eau distillée, l'inoculation étant pratiquée après un quart d'heure de contact. Ces expériences ont été relatées ailleurs (1). Les lapins avaient reçu respectivement des doses de cultures de 20 c. c. 5 en 2 mois, 14 cent. cubes 5 en 2 mois et demi, 35 cent. cubes en 3 mois ; leurs sérums ne se sont pas montrés plus antihémolytiques que des sérums normaux.

(1) C. R. Soc. Biologie, 1927, t. 56, p. 184.

POUVOIR HEMOLYTIQUE ET AUTRES PROPRIÉTÉS DES STREPTOCOQUES

On peut se demander quelle est la *fréquence du pouvoir hémolytique* parmi les streptocoques. Ceux-ci sont vraisemblablement plus souvent hémolytiques qu'on ne pense. Nous rappelons à l'appui de cette remarque combien sont nombreuses les causes d'erreur inhérentes à la recherche du pouvoir hémolytique. Elles restent d'abord dans l'emploi de la gélose au sang, milieu fréquemment adopté, d'autre part l'utilisation non moins répandue des milieux glucosés, surtout fortement glucosés (1 p. 100, par exemple), peut également masquer l'existence du pouvoir hémolytique, enfin certains échantillons de streptocoques ne fournissent, nous l'avons vu, d'hémolysine, que durant un stade éphémère de leur développement. Aussi avant d'affirmer l'absence de tout pouvoir hémolytique, s'impose un examen minutieux, de cultures en bouillon-sérum d'âges variés. Sur 40 échantillons de streptocoques, étudiés par nous, de *provenance humaine ou aviaire* 11 seulement se sont montrés dépourvus de tout pouvoir hémolytique.

La lecture du tableau page 36 montre *l'inégalité de ce pouvoir hémolytique* chez les divers échantillons, tant *aviaires qu'humains*.

Échantillons (1)	ORIGINE	Degré d'hémolyse (bouillon Martin sérum équin). Le chiffre indique le numéro du dernier tube hémolysé.		Dose mortelle, sous la peau, de culture liquide exprimée en cent. cube ou fractions de cent. cube.	
		Culture de 8 h.	Culture de 16 h.	Souris	Lapin
Hémo.....	humaine (hémoculture)	8		10^{-1} au moins	1 = survie
Vir.....	humaine (abcès)	7	6	10^{-1} au moins	1 = survie
O.....	humaine (otite)	7	5	$\frac{1}{2}$ au moins	1 = survie
Cavum.....	humaine	7	4		1 = survie
Darbe.....	humaine	7			1 = survie
Bar.....	humaine (otite)	7		10^{-1} au moins	1 = survie
Netter.....	humaine (méningite)	6	6		10^{-1} = survie
Caillat.....	humaine	6	6	10^{-1} au moins	1 = survie
Lion.....	humaine (otite)	6	5		10^{-1} = survie
Mil.....	humaine (otite scarlati- neuse)	6	5	10^{-1} = survie	1 = survie
Calvez.....	humaine (angine)	6		10^{-1} = survie	10^{-1} = survie
Tallet.....	humaine (mastôidite)	6	0	10^{-1} = survie	1 = survie
Hay.....	humaine (pleurésie)	4	0	10^{-1} = survie	$\frac{1}{4}$ = survie
Masto.....	humaine (mastôidite)	3	2	$\frac{1}{2}$ = survie	1 = survie
Norbert.....	humaine (abcès)	0	4	10^{-1} au moins	1 = survie
Mercédès.....	humaine (anasarque)	0	3	10^{-1} au moins	1 = survie
Macé.....	humaine (fièvre puerpérale)	0	1		10^{-1} = survie
Johnes.....	humaine (broncho-pneumonie)	0	0	$\frac{1}{2}$ = survie	1 = survie
Widal.....	humaine (pleurésie)	0	0	$\frac{1}{2}$ = survie	
L. L.....	humaine (endocardite)	0	0	10^{-1} = survie	1 = survie
M.....	humaine (endocardite)	0	0	$\frac{1}{2}$ = survie	1 = survie
Désir.....	humaine (pyélo-néphrite)	0		10^{-1} = survie	1 = survie
Bonot.....	aviaire (poule)	7	7	10^{-5} = au moins	10^{-4} au moins
Maurice.....	aviaire (poule)	7	2	10^{-3} = au moins	10^{-5} au moins
R. T.....	aviaire (poule)	6	3	10^{-1} = au moins	1 = survie
Petiot.....	aviaire (poule)	6	0		1 = survie
Truche.....	aviaire (poule)	6	0		1 = survie
Lebigre.....	aviaire (poule)	5	0	10^{-4} au moins	10^{-4} au moins
Goulin.....	aviaire (poule)	4	2	10^{-7} mort inconstante	10^{-7} au moins
Pion.....	aviaire (poule)	2	7	10^{-1} au moins	10^{-5}
Pérot.....	aviaire (poule)	0	0		1 = survie
Balourdet.....	aviaire (poule)	0	0	$\frac{1}{2}$ = survie	1 = survie
Guérin.....	aviaire (poule)	0	0	$\frac{1}{2}$ = survie	1 = survie
Dinde.....	aviaire (dinde)	0	0	10^{-1} = survie	1 = survie
Guérin II.....	aviaire (poule)	0	0	10^{-1} = survie	1 = survie
Tardif.....	aviaire (poule)	0	0		1 = survie
Laroque.....	aviaire (poule)	0		$\frac{1}{2}$ = survie	
Cotoni.....	lapin	7	1		10^{-2}
Cobaye 1.....	cobaye	7	0	10^{-1} au moins	1 = survie
Cobaye A.....	cobaye	6	3	10^{-1} au moins	

(1) Il n'est pas fait mention dans ce tableau de la production de méthémoglobine observée chez plusieurs échantillons, ce phénomène n'entrant pas dans le cadre de notre étude.

Que devient le pouvoir hémolytique des échantillons de streptocoque conservés in vitro? Nous n'avons jamais observé chez de nombreux échantillons de streptocoques isolés depuis plusieurs mois, parfois plusieurs années et conservés à la glacière en ampoules de bouillon-sérum équín, de baisse notable du pouvoir hémolytique, quand ce dernier était recherché dans des cultures en bouillon-sérum, suivant la technique appropriée. Schottmüller, Jupille ont également insisté sur la stabilité du pouvoir hémolytique chez des échantillons isolés depuis longtemps de l'organisme. Il est juste d'ajouter que d'autres auteurs ont soutenu une opinion opposée. Ce qui disparaît de préférence au pouvoir hémolytique, c'est le pouvoir pathogène pour les animaux. Il est fréquent de voir des échantillons ayant tué le lapin sous la peau à très faibles doses 1/100.000^e c. c., par exemple, lors de l'isolement au sortir de l'organisme, ne tuer plus qu'à la dose de 1 c. c., mais *intact leur pouvoir hémolytique*.

Une autre question très discutée est celle des rapports du *pouvoir hémolytique* avec ce qu'on appelle la « *virulence* » des maladies dont proviennent les streptocoques. A cette question, les auteurs apportent les réponses les plus diverses, parfois absolument contraires. C'est qu'en réalité ce problème est posé de façon obscure. On s'entend assez bien sur le pouvoir hémolytique des streptocoques, bien qu'il soit estimé à l'aide de techniques diverses, mais une même technique peut permettre d'établir des degrés correspondant aux différents échantillons. Tandis qu'on prête au terme « *virulence des maladies* » des sens divers. Tout d'abord, on ne peut parler, est-il besoin de le dire, que d'infections de gravité variée, la virulence étant une propriété réservée aux agents pathogènes. D'ailleurs cette virulence elle-même ne nous est connue que par les animaux d'expériences, un titrage chez les hommes sains étant impossible. Si l'on considère la gravité des infections, il est à remarquer que des maladies graves, septicémie puerpérale mortelle, endocardite maligne, ne fournissent souvent que des échantillons de streptocoques dénués de pouvoir pathogène pour les animaux d'expérience usuels. D'autre part, existe-t-il même un rapport nécessaire entre l'intensité de l'hémolyse et l'intensité du pouvoir pathogène pour les animaux? Les streptocoques hémolytiques sont-ils les streptocoques virulents pour les animaux? Bordet, Besredka, Lingelsheim, Marmorek soulignent l'importance du rapport entre l'intensité de l'hémolyse et le degré du pouvoir pathogène pour les animaux.

Certains auteurs ont même été jusqu'à prétendre titrer la virulence pour le lapin par le pouvoir hémolytique vis-à-vis des héma-

ties de cette espèce. Mais la lecture du tableau précédent montre que si les échantillons franchement pathogènes pour la souris et le lapin hémolysent les globules du mouton, la réciproque n'est pas exacte : on rencontre des échantillons fortement hémolytiques, peu ou pas pathogènes pour la souris et le lapin. D'autre part nous n'avons pas trouvé dans nos recherches d'échantillons franchement pathogènes pour le lapin et la souris et dépourvus de propriétés hémolytiques. Rappelons enfin que chez les streptocoques conservés *in vitro*, la persistance du pouvoir hémolytique s'oppose parfois à la baisse du pouvoir pathogène.

En conclusion, certains échantillons de streptocoques, d'origine diverses, produisent dans leurs cultures et chez les animaux infectés, des substances hémolysant les globules rouges de mouton et de plusieurs espèces animales. Les milieux liquides électifs pour la mise en évidence de l'hémolyse sont les milieux additionnés d'humeurs animales. L'addition de glucose favorise le développement microbien, mais à doses trop élevées, empêche l'hémolyse. La propriété hémolytique apparaît dans les cultures aérobies et anaérobies et disparaît à une époque variable suivant les échantillons de streptocoques ; pour certains, l'hémolyse n'est observable que pendant un temps court entre la 7^e et la 16^e heure du développement, et disparaît peu à peu à partir de la 16^e heure. Les substances hémolysantes existent à un stade précoce de développement dans les « liquides clairs » ; à noter, par opposition la remarquable résistance des streptocoques à l'autolyse. La dose hémolysante minimum de culture varie beaucoup avec l'échantillon microbien observé. Les substances en question disparaissent par le chauffage, l'addition d'antiseptiques. Elles agissent à une température optimum voisine de 37°. Injectée dans les veines du lapin et de la souris sous forme de cultures filtrées, elles peuvent produire l'hémolyse *in vivo*. Injectées au lapin, elles ne provoquent pas l'apparition d'antistreptolysine dans ses humeurs ; presque tous les auteurs s'accordent là-dessus. *Ce caractère négatif nous paraît d'une grande importance et suffit à lui seul pour séparer à l'heure actuelle l'hémolysine streptococcique des hémotoxines microbiennes vraies.* Les substances streptococciques hémolysantes traversent les filtres. Leur nature demeure inconnue. Le pouvoir hémolytique d'un échantillon de streptocoque n'offre pas de relation nécessaire et constante avec le pouvoir pathogène vis-à-vis de la souris et du lapin.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,
RADAIS,

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY,

Vu :

Le Doyen de la Faculté,
RADAIS.

